

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/19980 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/10, REINHARDT, Richard [DE/DE]; Brümmerstrasse 74, D-14195 Berlin (DE). NORDHOFF, Eckard [DE/DE]; Tillmannsweg 5, D-14109 Berlin (DE).  
C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08807
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. September 2000 (08.09.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 43 374.7 10. September 1999 (10.09.1999) DE Veröffentlicht:  
— Mit internationalem Recherchenbericht.  
— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, D-80539 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RAUTH, Holger [DE/DE]; Neue Kulmer Strasse 5, D-10827 Berlin (DE).
- (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, 81679 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): CA, US.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR BINDING NUCLEIC ACIDS TO A SOLID PHASE

WO 01/19980 A1

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ANBINDEN VON NUKLEINSÄUREN AN EINE FESTPHASE

(57) Abstract: The invention relates to a method for binding nucleic acids to a solid phase during which a solution containing a nucleic acid is brought into contact with a solid phase, which has hydrophobic and hydrophilic groups on the surface and/or which comprises a hydrophilic polymer matrix that contains water, in the presence of dehydrating reagents, especially in the presence of a salt and polyethylene glycol, whereby the nucleic acids are bound to the surface.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zum Anbinden von Nukleinsäuren an eine Festphase beschrieben, bei dem eine Nukleinsäure enthaltende Lösung mit einer Festphase, die hydrophobe und hydrophile Gruppen auf der Oberfläche aufweist oder/und eine hydrophile wasserhaltige Polymermatrix umfasst in Gegenwart wasserentziehender Reagenzien, insbesondere in Gegenwart eines Salzes und Polyethylenglykols in Kontakt gebracht wird, wobei die Nukleinsäure an die Oberfläche gebunden wird.

## Verfahren zum Anbinden von Nukleinsäuren an eine Festphase

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Anbinden bzw. Immobilisieren von Nukleinsäuren an eine Festphase sowie zum Aufreinigen der gebundenen Nukleinsäuren, wobei die Festphase mit hydrophilen und hydrophoben Gruppen belegt ist, oder/und eine hydrophile wasserhaltige Polymermatrix.

10

Für viele Arbeitstechniken ist es erforderlich, daß die eingesetzten Nukleinsäuren, insbesondere DNA, frei von störenden Begleitsubstanzen sind. Mit herkömmlichen Verfahren erhaltene Nukleinsäuren müssen deshalb vor einer Weiterverwendung in den meisten Fällen aufgereinigt werden.

15

Beispielsweise müssen vor einer Sequenzierung von PCR (Polymerasekettenreaktion) -Produkten unerwünschte Nebenprodukte, überschüssiger Primer, nicht eingebaute Nukleotide und Salze des Reaktionspuffers abgetrennt werden, da sie die Sequenzierreaktion stören könnten. Auch bei einer Vervielfältigung von DNA mit Hilfe von Zellen muß

20

vor der Weiterverarbeitung der gewünschten DNA eine Aufreinigung erfolgen, bei der das Zelldebris nach einer Lyse abgetrennt wird. Die gewünschte DNA muß dann vor der Verwendung, z.B. für einen Restriktionsverdau oder eine Sequenzierreaktion, von Verunreinigungen, wie RNA, Proteinen, Salzen und dgl. befreit werden. Auch für eine quantitative

25

Bestimmung von Nukleinsäuren, beispielsweise über UV-Absorptionsmessungen, ist zunächst eine Aufreinigung erforderlich, da für eine fehlerfreie Bestimmung die verwendete Nukleinsäurelösung frei von anderen Bestandteilen sein muß, die im gleichen Wellenbereich wie das gewünschte Produkt absorbieren, beispielsweise RNA, Primer, Nukleotide

30

und dgl. Auch bei einer Konzentrationsbestimmung durch fluorimetrische Messungen müssen aufgereinigte Nukleinsäuren verwendet werden, damit es nicht zu unspezifischer, das Ergebnis verfälschender Fluoreszenz kommt.

Bei massenspektrometrischen Untersuchungen von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, beispielsweise mit MALDI-MS (Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation-Mass Spectrometry; Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie) ist es nötig, daß die Probemoleküle  
5 weitgehend frei von Begleitstoffen, wie etwa Puffersubstanzen, Metallkationen, Primerüberschüssen, Peptiden, Lipiden, Detergentien und dgl., sind, welche die Analyse stören könnten. Weiterhin wird eine Nukleinsäure zur Durchführung einer MALDI-MS-Analyse vorteilhafterweise in die Ammoniumform überführt. Auf diese Weise lassen sich diskrete Analyt-  
10 signale und ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis erreichen, und die Diskriminierung des Probensignals durch Begleitstoffe wird vermieden.

Bei der Aufarbeitung von wenigen Proben kann die Aufreinigung zwar manuell mit aufwendigen Techniken erfolgen. Zur Bewältigung einer  
15 größeren Anzahl von Proben ist es jedoch erforderlich, ein geeignetes, technisch einfaches und kostengünstiges Aufreinigungsverfahren bereitzustellen, das automatisiert werden kann, um den geforderten Durchsatz zu bewältigen.

20 Bisher sind verschiedene Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren bekannt. Bei der Reinigung über Säulen kommen unterschiedliche Techniken zum Einsatz. Beispielsweise wird beim QIAquickPCR Purification Kit von Qiagen DNA mit Hilfe eines speziellen Bindungspuffers an eine Silicamembran adsorbiert. Der Bindungspuffer bewirkt, daß nur DNA bestimmter  
25 Länge adsorbiert wird und überschüssiger Primer und Nukleotide abgetrennt werden können. Nach dem Waschen der DNA wird diese dann mit einem geeigneten Elutionsmittel von der Säule eluiert.

Bei der Ausschluß-Chromatographie wird eine flüssige Phase, welche  
30 gelöste DNA enthält, auf eine Gelmatrix gegeben, wobei die Makromoleküle in Abhängigkeit ihrer Größe verschieden tief in das Netzwerk der Matrix eindringen. Kleinere Moleküle dringen tiefer ein als größere Moleküle und

- 3 -

werden somit länger auf der Säule zurückgehalten. Moleküle, die größer als die größten Poren der verwendeten gequollenen Gelmatrix sind, können die Gelkörner nicht durchdringen und wandern an diesen vorbei, so daß sie die Säule zuerst verlassen. Aufgrund der unterschiedlichen Größe von  
5 gewünschter DNA auf der einen Seite und Primern und Nukleotiden auf der anderen Seite, kann eine Aufreinigung erfolgen. Ein häufig verwendetes Material für die Gelmatrix ist Sephacryl von Pharmacia.

Bei den Säulentechniken wird das Eluat üblicherweise durch Zentrifugation  
10 erhalten, weshalb diese Techniken nur mit sehr hohem Aufwand automatisiert werden können. Damit sind Säulentechniken nicht für einen hohen Probendurchsatz geeignet. Darüber hinaus ist die Aufreinigung über Säulen mit einem komplexen apparativen Aufwand und damit mit hohen Kosten verbunden.

15 Ein weiteres Verfahren zur Aufreinigung von DNA ist die präparative Isolierung mittels Gelelektrophorese. Dabei werden die Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Die gewünschte Bande mit den interessierenden Molekülen wird ausgeschnitten, und diese werden dann direkt aus dem Gel eluiert.  
20 Auch dieses Verfahren ist nur schwer zu automatisieren, wobei der limitierende Schritt das Ausschneiden der gewünschten Bande ist. Diese Methode konnte deshalb bisher nur für den manuellen Einsatz verwendet werden.

25 Ein weiteres Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren ist die Magnetseparation mittels spezifischer Bindung der Nukleinsäuren an eine funktionalisierte Oberfläche. Bei einer spezifischen Bindung werden gezielt nur bestimmte DNA-Fragmente über hochaffine Wechselwirkungen oder kovalente Bindung an Partikel gebunden. Beispielsweise werden an mit  
30 immobilisiertem Streptavidin ausgestattete Magnetpartikel über hochaffine Wechselwirkungen biotinylierte Produkte gebunden. Neben der Verwendung von Oberflächen, die einen Partner eines spezifischen Bindepaares tragen,

- 4 -

können auch Partikel verwendet werden, die an ihrer Oberfläche einen Primer tragen. Unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen werden dann nur Fragmente mit zu diesem Primer komplementärer Sequenz gebunden. Diese Verfahren erfordern jedoch eine aufwendige Vorbereitung sowohl der  
5 Festphasen als auch der aufzureinigenden Moleküle, beispielsweise durch Derivatisierung und sind auf so vorbereitete Moleküle limitiert.

WO 94/11103 beschreibt solch ein Verfahren unter Verwendung von magnetisierbaren Polymerpartikeln, die auf ihrer Oberfläche spezifische  
10 Affinitätsliganden tragen.

EP 0 885 958 beschreibt ein Verfahren zur Isolierung von DNA unter Verwendung von mindestens zwei verschiedenen Magnetpartikeln, die Partner eines spezifischen Bindepaares, beispielsweise Sonden, Biotin oder  
15 Streptavidin tragen.

US-Patent 5,405,951 beschreibt ein Verfahren, bei dem DNA unter Verwendung von chaotropen Salzen an Silicaoberflächen gebunden wird. Chaotrope Salze sind jedoch gesundheitsgefährdend. Zudem ist bei dem im  
20 US-Patent 5,405,951 beschriebenen Verfahren ein Arbeiten bei erhöhter Temperatur erforderlich.

US-Patent 5,705,628 beschreibt ein Verfahren, bei dem DNA unter Verwendung eines Bindepuffers an magnetische Mikropartikel gebunden  
25 wird, die eine mit Carboxylgruppen ausgestattete Oberfläche aufweisen. Allerdings werden dort aufgrund der geringen Ausbeute relativ viele Partikel pro Probe benötigt und die Carboxylgruppen-Modifikation erlaubt nur die Verwendung von wenigen, speziellen Partikelsorten.

30 Aufgabe der Erfindung war es somit, ein Verfahren zur Immobilisierung/Anbindung bzw. Aufreinigung von Nukleinsäuren bereitzustellen, welches die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Verfahren zumindest

- 5 -

teilweise vermeidet und welches insbesondere eine einfache und kosteneffiziente Aufreinigung einer großen Anzahl von Proben ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum  
5 Anbinden von Nukleinsäuren an eine Festphase, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Nukleinsäuren enthaltende Lösung mit einer Festphase, die hydrophobe und hydrophile Gruppen auf der Oberfläche aufweist, in Gegenwart eines Salzes und Polyethylenglykols in Kontakt gebracht wird, wobei die Nukleinsäuren an die Oberfläche gebunden werden. Unter diesen  
10 Bedingungen binden die Nukleinsäuremoleküle an besagte Oberfläche und stehen somit für festphasengestützte Waschvorgänge bereit, während derer störende Substanzen effektiv abgetrennt werden können und bei Bedarf die Probenmoleküle in die für die Massenspektrometrie günstige Ammoniumform überführt werden können.

15 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäuren aus Lösungen isoliert werden, wobei unter dem Begriff Nukleinsäure auch deren Salze zu verstehen sind. Die Bindung der Nukleinsäuren an die Oberfläche der Festphase erfolgt bevorzugt reversibel und unspezifisch und ist somit nicht  
20 durch spezielle hochaffine Bindepaare, wie etwa Streptavidin/Avidin, oder auf Nukleinsäuren mit bestimmten Sequenzabschnitten begrenzt, die z.B. durch Hybridisierung an die Oberflächen gebunden werden. Die Bindung von Nukleinsäuren erfolgt erfindungsgemäß vielmehr sequenzunabhängig, so daß eine universelle Bindematrix für Nukleinsäuren erhalten wird. Das Verfahren  
25 ist technisch einfach durchzuführen und kann ohne großen Aufwand automatisiert werden, so daß ein hoher Probendurchsatz bei geringen Kosten möglich ist. Das Immobilisieren und auch das Eluieren der Nukleinsäuren von der Oberfläche kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Weiterhin wurde überraschenderweise festgestellt, daß Nukleinsäuren mit  
30 hoher Ausbeute an besagte Oberflächen gebunden werden können. Dies hat zur Folge, daß bei dem erfindungsgemäßen Verfahren weniger Partikel pro

Probe eingesetzt werden müssen als bei bekannten Verfahren, wodurch eine weitere Vereinfachung und Kostenverringerung erzielt werden kann.

5 Bevorzugt weist der mit der Lösung in Kontakt gebrachte Teil der verwendeten Festphase einen Anteil von  $\geq 1\%$ , insbesondere  $\geq 5\%$  bevorzugt  $\geq 10\%$  und von  $\leq 90\%$ , insbesondere  $\leq 50\%$  und bevorzugt  $\leq 30\%$  an hydrophoben chemischen Oberflächengruppen auf. Dabei ist zu beachten, daß ab einem gewissen Anteil an hydrophoben Oberflächengruppen, der für die jeweilige Festphase ohne weiteres vom Fachmann bestimmt  
10 werden kann, ein Verklumpen von Festphasenpartikeln in wäßriger Lösung auftritt, mit der Folge, daß die Festphase nicht mehr resuspendierbar ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt werden kleine, insbesondere magnetische Partikel eingesetzt, die auf ihrer Oberfläche funktionelle, hydrophobe  
15 Gruppen, wie etwa Alkyl- oder Arylgruppen tragen, verwendet, woran Nukleinsäuren unspezifisch und reversibel gebunden werden können. Günstigerweise werden aus der Umkehrphasenchromatographie bekannte funktionelle Gruppen verwendet, da deren Immobilisierung und Handhabung gut verstanden und etabliert ist.

20

Es ist auch möglich, eine Festphase mit mehreren, voneinander z.B. durch inerte Bereiche abgegrenzten aktiven Oberflächenbereichen zu verwenden, um mehrere räumlich voneinander abgegrenzte Reagenzfelder bereitzustellen.

25

Besagte Oberfläche auf der Festphase kann, sofern nicht vorhanden, durch Derivatisierung oder durch Beschichtung bereitgestellt werden. Diese Verfahrensweise hat den Vorteil, daß das Material für die Festphase frei wählbar ist. Die hydrophoben chemischen Gruppen sind vorzugsweise  
30 organische Kohlenwasserstoff-enthaltende Gruppen und können cyclische, lineare oder/und verzweigte Strukturen aufweisen. Bevorzugt trägt die Oberfläche  $C_1$ - $C_{30}$ -Alkylgruppen, oder  $C_5$ - $C_{30}$ -Arylgruppen, insbesondere  $C_6$ -

C<sub>24</sub>-Alkylgruppen als funktionelle, hydrophobe Gruppen. Besonders bevorzugt werden die Alkylgruppen ausgewählt aus C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>18</sub>-Alkyl und Mischungen davon, wobei Octadecyl-Liganden am meisten bevorzugt sind.

- 5 Neben hydrophoben Gruppen weist die Oberfläche weiterhin hydrophile chemische Gruppen, z.B. Hydroxyl- oder/und Oxidgruppen, auf, die ggf. bei einer der unten genannten Vor- bzw. Zwischenbeschichtungen bereits vorhanden sein können. Wie oben ausgeführt neigen insbesondere kleine Partikel mit ausschließlich hydrophober Oberfläche zum Verklumpen in
- 10 wäßrigen Lösungen. Dieses Problem kann vermieden werden, indem den funktionellen hydrophoben Gruppen hydrophile Gruppen, insbesondere Hydroxylreste zur Seite gestellt werden. Die Hydroxylgruppen können anorganische Hydroxylgruppen, z.B. Kieselsäuregruppen, oder/und organische Hydroxylgruppen, z.B. Mono- oder Polysaccharide wie Agarose,
- 15 umfassen. Weitere geeignete hydrophile Gruppen umfassen Carbonyl-, Carboxyl-, Ester-, Amino-, Thiol-, Sulfat-, Sulfonyl- und ähnliche Gruppen und Kombinationen solcher Gruppen. Auch Polyolderivate, wie etwa Polyalkylen-glykolderivate können als hydrophile Gruppen eingesetzt werden.
- 20 Die Anordnung und das Verhältnis von hydrophoben und hydrophilen Gruppen in dem zur Anbindung der Nukleinsäuren vorgesehenen Bereich der Oberfläche wird so eingestellt, daß die jeweiligen Partikel in wäßriger Lösung gerade nicht mehr verklumpen, die Bindung der Nukleinsäure aber noch wirksam stattfindet. Die funktionellen Gruppen sowie deren Anord-
- 25 nung können vom Fachmann den jeweiligen Parametern, wie etwa der Partikelgröße, der Partikeldichte, dem Analyten etc. angepaßt ausgewählt werden. Es ist beispielsweise möglich, die hydrophilen Gruppen in von den hydrophoben Gruppen abgegrenzten, separaten Mikrobereichen aufzubringen. Bevorzugt ist jedoch eine "Mischoberfläche", in der die hydrophoben
- 30 und hydrophilen Gruppen nebeneinander vorliegen. Die hydrophilen Gruppen können auch durch geeignet substituierte organische Moleküle, z.B. Hydroxy-substituierte Alkyle eingebracht werden. Ein Beispiel für eine



bevorzugte Mischoberfläche ist eine Alkyl/OH-Oberfläche, insbesondere eine C<sub>18</sub>-Alkyl/OH-Oberfläche.

5 Besagte Oberflächen können direkt oder mittels einer Vor- oder Zwischenbeschichtung auf die Festphase aufgebracht sein. Geeignete Vorbeschichtungen sind beispielsweise eine Polykieselsäurematrix oder/und eine Monosaccharidmatrix. Andere geeignete Vorbeschichtungen sind Partner eines spezifischen Bindepaares, beispielsweise Streptavidin/Avidin, auf die dann die eigentliche aktive Schicht aufgebracht wird. Die Bindung der hydrophoben oder/und hydrophilen Gruppen an die Festphase bzw. die Bindung der hydrophoben oder/und hydrophilen Beschichtung an die Vorbeschichtung und die Bindung der Vorbeschichtung an die Festphase kann z.B. kovalent, z.B. durch Veresterung, adsorptiv oder über hochaffine Wechselwirkungen erfolgen. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine  
10 Vorbeschichtung bestehend aus Polykieselsäure und Monosaccharid auf eine Festphase, beispielsweise  $\gamma$ -Eisenoxidpartikel mit einem Durchmesser im Nanometer- oder Mikrometerbereich aufgebracht. Diese Vorbeschichtung wird dann mit hydrophoben Gruppen, insbesondere Alkylgruppen und ggf. auch mit hydrophilen Gruppen, ausgestattet. Besonders gute Ergebnisse wurden mit Partikeln erhalten, die 10 bis 15% Alkylgruppen, insbesondere Octadecylgruppen pro Kieselsäure-Matrix (mol/mol) und 0,2 % Octadecylgruppen pro Monosaccharid-Einheit (mol/mol) aufweisen.  
15  
20

Als Festphase kann jede dem Fachmann bekannte Festphase verwendet werden, wie etwa Mikrotiterplatten, Gefäße, wie etwa Eppendorf-Gefäße, Greiner tubes, Nunc Röhrchen etc. Bevorzugt werden als Festphase Feststoffpartikel mit einem Durchmesser  $\geq 1$  nm bis  $\leq 1$  mm eingesetzt, wodurch eine günstige spezifische Oberfläche pro Gramm Partikel zugänglich ist. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt den Einsatz verschiedenster Festphasenmaterialien. Bevorzugt wird als Festphasenmaterial Silica,  
25 ein Kunststoff wie etwa Polystyrol, oder ein magnetisches oder magnetisierbares Material verwendet und insbesondere  $\gamma$ -Eisenoxid.  
30

Wenn eine magnetische Festphase verwendet wird, können weitere Vorteile erhalten werden. Eine Magnetseparation ist relativ einfach durchzuführen und kann leicht automatisiert werden. Wenn paramagnetische oder para- und ferromagnetische Partikel als Festphase verwendet werden, kann  
5 zudem ein Zusammenklumpen der Feststoffpartikel weiter vermindert werden. Üblicherweise werden für die magnetische Partikeltechnologie (z.B. der Firma Dynal, Oslo, Norwegen) kleine magnetische Partikel mit einem Durchmesser im nm- oder  $\mu\text{m}$ -Bereich verwendet, bei welchen das Problem des Verklumpens besonders stark ist. Die erfindungsgemäße Aufreinigung  
10 kann aber ohne Verklumpen durchgeführt werden, da den hydrophoben Gruppen in ausreichender Zahl hydrophile Gruppen, insbesondere Hydroxylgruppen zur Seite gestellt werden.

Die Anbindung von Nukleinsäuren bzw. deren Salzen an besagte Oberfläche  
15 wird erfindungsgemäß durch einen Bindepuffer vermittelt. Dieser Bindepuffer enthält ein Salz sowie Polyethylenglykol. Als Salz wird bevorzugt ein Alkali-, Erdalkali- oder/und Ammoniumsalz verwendet, welches als Kation, insbesondere ein Li-, Na-, K-, Rb-, Cs-, Fr-, Be-, Mg-, Ca-, Sr-, Ba-, Ra- oder/und  $\text{NH}_4$ -Ion enthält. Als Anion enthält das erfindungsgemäß ver-  
20 wendete Salz bevorzugt ein Halogenidanion, insbesondere ein Chloridanion. Das verwendete Polyethylenglykol (PEG) weist bevorzugt eine mittlere Molmasse von 1000 bis 20000 g/Mol, insbesondere von 6000 bis 15000 g/Mol auf.

25 Da die Viskosität mit steigendem PEG-Gehalt zunimmt, wird dem Bindepuffer bevorzugt ein Alkohol, insbesondere Methanol, Ethanol, Propanol und/oder Butanol, besonders bevorzugt Ethanol oder/und 2-Propanol zugegeben. Der Alkoholgehalt im Bindungspuffer kann bis zu 50 Gew.-% betragen, bevorzugt 30 bis 40 Gew.-%.

30

Im allgemeinen wird für das erfindungsgemäße Verfahren das Salz bevorzugt in einer Konzentration von  $\leq 5 \text{ mmol/l}$ , insbesondere von 5

- 10 -

mmol/l bis 4 mol/l, insbesondere bis zu 3 mol/l und das Polyethylenglykol bevorzugt in einer Konzentration von 5 bis 40 %, eingesetzt. Die angegebenen Konzentrationen an Salz und PEG sind finale Konzentrationen und beziehen sich auf die Bindungsbedingungen, d.h. auf das endgültige Gemisch, das Probe und Bindungspuffer und ggf. weitere Verdünnungsmittel, wie etwa Wasser, umfaßt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, DNA über einen großen Molmassenbereich zu immobilisieren und aufzureinigen. Es ist sowohl möglich, nur wenige Basen große Einzelstrang-DNA aufzureinigen als auch mehrere 100 kb große Doppelstrang-DNA, insbesondere BACs, PACs und dgl.

Nukleinsäuren, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgereinigt werden können, umfassen z.B. Einzelstrang-DNA, Doppelstrang-DNA, RNA, LNA sowie Nukleinsäure-Protein-, Nukleinsäure-PNA- und Nukleinsäure-Zucker-Adukte oder Komplexe. Bevorzugt werden Nukleinsäuren immobilisiert, bei denen es sich um Amplifikationsprodukte, beispielsweise aus einer PCR-Reaktion, handelt oder die durch Amplifikation mit Hilfe von Zellen, z.B. mittels einer Übernacht-Kultur, erhalten wurden oder um Sequenzierungsreaktionsprodukte, Primer-Extensionsreaktionsprodukte, Ligasekettenreaktionsprodukte, Restriktionsendonukleaseverdauprodukte, etc. Es können aber auch synthetisch hergestellte Nukleinsäuren gebunden werden.

Anhand der Konzentration der Bestandteile, insbesondere von Salz und PEG, läßt sich die selektive Anbindung der Einzel- und Doppelstrang-Nukleinsäuren an besagte Oberfläche einstellen. Dabei kann eine Selektivität  $\geq 70\%$ , insbesondere  $\geq 80\%$  und besonders bevorzugt  $\geq 90\%$  erzielt werden. Bei einer Konzentration an einwertigen Kationen von 0,5 bis 4 mol/l, zweiwertigen Kationen  $\leq 5$  mmol/l und PEG  $\leq 15$  Gew.-% binden selektiv ds-Nukleinsäuren  $\geq 80$  bp auch in Gegenwart von ss-Nukleinsäuren. Die Anbindung von ss-Nukleinsäuren gelingt durch Einstellen der Konzentration

- 11 -

zweiwertiger Kationen  $> 5$  mmol/l und  $< 100$  mmol/l und PEG von 10 bis 30 Gew.-%. Die Kombination beider Methoden ermöglicht die selektive Aufreinigung von ss- und ds-Nukleinsäuren. Doppelstrang-Nukleinsäuren lassen sich durch Einstellen der Salz- und PEG-Konzentrationen innerhalb der  
5 zuvor genannten Bereiche auch nach Größe fraktionieren. Für kleine Nukleinsäuren, insbesondere DNA, hat sich die Verwendung einer finalen Kombination an PEG von 15 - 40 % (Gew./Gew.) und einem Salzgehalt von 10 bis 1000 mmol/l als vorteilhaft erwiesen.

- 10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Isolierung oder/und Aufreinigung von Nukleinsäuren umfassend die Schritte
- (a) Bereitstellen einer Nukleinsäure enthaltenden Lösung,
  - (b) Inkontaktbringen der Nukleinsäure enthaltenden Lösung mit einer Festphase, die hydrophobe und hydrophile Gruppen auf der Oberflä-  
15 che aufweist, in Gegenwart eines Salzes und Polyethylenglykol, wobei die Nukleinsäure an die Oberfläche gebunden wird,
  - (c) Abtrennen der Festphase von der Lösung und
  - (d) gegebenenfalls Ablösen der Nukleinsäure von der Festphase.
- 20 Bei der bevorzugten Verwendung einer magnetischen Festphase ist das Abtrennen der Festphase von der Lösung durch magnetische Mittel möglich und kann somit leicht automatisiert werden.

Die Festphase wird bevorzugt einmal vor ihrem Einsatz gewaschen.  
25 Abhängig von Anwendung und Oberfläche kann z.B. zum Waschen der mit Wasser (bevorzugt 1:1) verdünnte Bindungspuffer (BP) verwendet werden. Es kann auch eine Lösung von 0,5 mol/l EDTA pH 8 - 9 eingesetzt werden. Wenn eine anschließende Analyse der Probe beabsichtigt ist, kann es sinnvoll sein, die Festphase mit mehreren Puffern zu waschen, u.a. auch mit  
30 einem Ammoniumacetat-Puffer.

- 12 -

Eine weitere Verbesserung der Aufreinigung kann dadurch erhalten werden, daß die abgetrennte Festphase, an deren Oberfläche die Nukleinsäure gebunden ist, mit einer Pufferlösung gewaschen wird, welche an die Festphase gebundene Verunreinigungen, nicht aber an die Festphase gebundene Nukleinsäure löst. Die Zusammensetzung der Waschlösung wird  
5 in Abhängigkeit der Anwendung und der Oberfläche ausgewählt. Als Waschlösung geeignet ist z.B. 50 - 70 % (vol/vol) Ethanol oder 2-Propanol, ggf. mit Zusätzen von EDTA, CDTA und TRIS in millimolaren Konzentrationen. Falls die Probe anschließend mit Massenspektrometrie analysiert  
10 werden soll, ist die Verwendung einer Ammoniumacetat enthaltenden Waschlösung in wenigstens einem Waschschrift bevorzugt, z.B. 0,05 bis 5 mol/l Ammoniumacetat in 60 bis 80 % Ethanol. Oftmals ist es auch vorteilhaft, zur Aufreinigung mehrere Waschschrift mit unterschiedlichen Waschpuffern durchzuführen.

15 Die auf besagter Oberfläche gebundenen Nukleinsäuremoleküle bzw. deren Salze werden bevorzugt mittels einer Elutionslösung abgetrennt, wobei als Elutionslösung jede Flüssigkeit verwendet werden kann, die die Nukleinsäure wieder von der Festphase ablöst. Die Wahl der Elutionslösung hängt von der  
20 Art der verwendeten Oberfläche und des Analyten sowie von der nachfolgenden Verwendung des Analyten ab. Bevorzugt werden als Elutionslösung bidestilliertes Wasser, pH 7 bis 8, eine wäßrige TRIS Lösung mit einer TRIS-Konzentration von 1 bis 100 mmol/l, bevorzugt mit einem pH-Wert von 7 bis 9, eine Formamidlösung, ein Loading Buffer für die Elektrophorese, eine  
25 Matrixlösung, z.B. 3-Hydroxypicolinsäure in Wasser (1 - 200 mmol/l) für MALDI-MS etc. verwendet.

Eine magnetische Festphase kann nach Ablösung der Nukleinsäure wiederum mit magnetischen Mitteln abgetrennt werden, wodurch eine  
30 vollständige Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens erreicht werden kann.

Die mit den erfindungsgemäßen Verfahren isolierten oder/und aufgereinigten Nukleinsäuren können unmittelbar für eine weitere Analyse, z.B. eine Massenspektrometrie (MS)-Analyse verwendet werden. Die bisherige aufwendige manuelle Reinigung über Säulen ist nicht erforderlich. Vielmehr ist es möglich, eine hohe Anzahl von Proben kostengünstig und schnell für eine MS-Analyse, insbesondere eine MALDI-MS-Analyse oder eine ESI (Elektrospray-Ionisation)-MS-Analyse automatisch aufzureinigen. Dabei können insbesondere Begleitstoffe, wie etwa Puffersubstanzen, Metallkationen, Primerüberschüsse, Peptide, Lipide, Detergentien und dgl. entfernt werden. Vorteilhafterweise wird die Nukleinsäure zur Durchführung einer MALDI-MS-Analyse in die Ammoniumform überführt, z.B. durch einen Ionenaustausch  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{NH}_4^+$ , der durchgeführt werden kann, während die Nukleinsäuren an die Oberfläche gebunden sind. Die Art der erfindungsgemäßen Anbindung ermöglicht also eine Reinigungsprozedur, d.h. die Nukleinsäure liegt in zugänglicher Form und nicht als Präzipitat vor. Für eine Analyse mit MALDI-MS sind insbesondere kleine DNA-Moleküle von Interesse. Erfindungsgemäß ist die Aufreinigung von kleinen DNA Molekülen oberhalb einer Mindestgröße von ca. 5 Nukleotiden, insbesondere  $\geq 10$  Nukleotiden möglich. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die bei der MALDI-MS-Analyse störenden Komponenten, wie etwa Puffersubstanzen und Metallkationen sowie evtl. vorhandene Primerüberschüsse effektiv abgetrennt. Die DNA-Moleküle werden zudem in die für eine MALDI-MS-Analyse kompatible Ammoniumform überführt und können wahlweise in reinem Wasser oder in einer wässrigen Matrixlösung eluiert werden und somit direkt auf das MALDI-Target transferiert werden. Eine Modifikation der Zusammensetzung der Bindungs- und Waschpuffer und der sequentielle Einsatz von Partikeln erlaubt es auch, größere DNA-Moleküle von der Aufreinigung auszuschließen, wodurch selektiv ein vorbestimmter Molmassenbereich ausgewählt werden kann, z.B.  $\geq 60$  bp und  $\leq 100$  bp.

Durch Variation der Salz- und PEG-Konzentration ist es auch möglich, kleine Oligonukleotide, wie etwa Primer (ssDNA), Primer-Extensionsprodukte, effizient für eine Analyse mit MALDI-MS aufzureinigen.

- 5 Ein weiterer Vorteil ist der breite Volumenbereich, in dem mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gearbeitet werden kann. Es sind Volumina von ml- bis zum oberen nl-Bereich möglich, insbesondere von  $< 10$  ml, bevorzugt  $< 1$  ml und besonders bevorzugt  $< 100 \mu\text{l}$  und  $\geq 100$  nl, bevorzugt  $\geq 1 \mu\text{l}$ . Der Volumenbereich kann für die jeweilige Applikation  
10 eingestellt werden, wobei bei kleinem Volumen eine konzentrierte Probe erhalten wird.

- Weiterhin ist es möglich, erfindungsgemäß angebundene Nukleinsäuren nach bekannten Verfahren zu sequenzieren. Die Sequenzierungsbedingun-  
15 gen von bekannten Verfahren stellen oftmals Elutionsbedingungen dar, d.h. während der eigentlichen Sequenzierung ist die Nukleinsäure dann nicht an die Festphase gebunden. In einem solchen Fall ist es vorteilhaft, für die Aufreinigung der Sequenzierprodukte nach Abschluß der Sequenzierreaktion wieder Anbindungsbedingungen, insbesondere durch Zugabe geeigneter  
20 Puffer einzustellen. Für die Sequenzierungsreaktion und anschließende Aufreinigung braucht die Festphase, insbesondere Beads, nicht abgetrennt werden. Es hat sich herausgestellt, daß die Festphasen, insbesondere Partikel, oftmals das zur Sequenzierung oft verwendete Thermocycling nicht unbeschadet überstehen. In einem solchen Fall werden nach der Sequenzier-  
25 reaktion neue, unverbrauchte Beads zugegeben.

- Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Synthetisierung von Nukleinsäuren, wobei erfindungsgemäß gebundene Nukleinsäuren nach bekannten Verfahren um mindestens 1 Nukleotid verlängert werden. Ein  
30 Beispiel für eine solche Reaktion ist die sog. Primer Extension Reaction, also die Verlängerung eines Primers (ssDNA) um mindestens 1 Nukleotid. Die Verlängerung kann durchgeführt werden, während die Nukleinsäure an die

Festphase gebunden ist. Da aber auch bei der Verlängerung von Nukleinsäuren oftmals Bedingungen eingestellt werden, die Elutionsbedingungen entsprechen, kann auch hier das Verlängern stattfinden, während die Nukleinsäure nicht an die Festphase gebunden ist und die Anbindung der verlängerten Nukleinsäure dann anschließend dadurch wieder erreicht werden, daß nach der Verlängerungsreaktion Bindungsbedingungen, beispielsweise durch Pufferzugabe eingestellt werden. Die Festphase braucht während der gesamten Reaktion nicht abgetrennt zu werden.

Die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren immobilisierten Nukleinsäuren können auch verwendet werden, um selektiv weitere, nachzuweisende Moleküle, beispielsweise Nukleinsäuren oder DNA-bindende Proteine zu binden und können deshalb in entsprechenden Assays eingesetzt werden. Somit umfaßt die Erfindung auch ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, wobei man eine Nukleinsäuren enthaltende Lösung mit einer Festphase, die hydrophobe und hydrophile chemische Gruppen aufweist, in Gegenwart eines Salzes und Polyethylenglykols in Kontakt bringt, wobei die Nukleinsäuren an die Oberfläche gebunden werden, anschliessend die gebundene Nukleinsäure aufweisende Festphase mit der Probe in Kontakt bringt und den Analyten über die Bindung an die gebundenen Nukleinsäuremoleküle nachweist.

Schließlich umfaßt die Erfindung auch einen Reagenzienkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, der einen Salz und Polyethylenglykol enthaltenden Bindepuffer und eine Festphase, deren Oberfläche hydrophobe und hydrophile Gruppen aufweist. Bevorzugt enthält ein solcher Reagenzienkit zusätzlich Wasch- und Elutionspuffer.

Weiterhin stellt die Erfindung ein Verfahren zum Anbinden von Nukleinsäuren an eine Festphase bereit, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Nukleinsäuren enthaltende Lösung mit einer Festphase, welche eine



hydrophile wasserhaltige Polymermatrix umfaßt, in Gegenwart von wasserentziehenden Reagenzien in Kontakt gebracht wird, wobei die Nukleinsäuren reversibel und sequenzunspezifisch an die Festphase gebunden werden.

5

Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß durch die Verwendung von hydrophilen wasserhaltigen Polymermatrices eine große Bindekapazität im Hinblick auf Nukleinsäuren erhalten werden kann und auch die Isolierung von sehr kleinen DNA-Fragmenten, beispielsweise mit einer Länge von 10 bis 100 Bp, insbesondere von 30 bis 70 Bp durchgeführt werden kann. Zudem ist in Abhängigkeit der Auswahl der hydrophilen wasserhaltigen Polymermatrix eine gröÙenselektive Bindung von Nukleinsäuren möglich.

10

Bevorzugt wird beim erfindungsgemäÙen Verfahren zuerst die hydrophile wasserhaltige Polymermatrix mit einer Nukleinsäuren enthaltenden Lösung in Kontakt gebracht und in einem zweiten Schritt dann ein wasserentziehendes Mittel zugegeben. Geeignete wasserentziehende Mittel sind Salze, insbesondere chaotrope Salzpuffer mit hoher Konzentration, sowie Polyethylenglykol. Bevorzugte Salze und Polyethylenglykole sowie deren Konzentration sind wie oben beschrieben.

15

20

Durch die Verwendung einer hydrophilen wasserhaltigen Polymermatrix als Festphasenmaterial anstelle von Silika oder Borsilikatglas, wie es üblicherweise verwendet wird, kann eine Bindung von Nukleinsäuren, welche reversibel und sequenzunspezifisch ist, erhalten werden. Die Polymermatrix enthält bevorzugt von 1 bis 90, mehr bevorzugt von 10 bis 50 Gew.-% Wasser.

25

Die hydrophile wasserhaltige Polymermatrix enthält bevorzugt ein hydrophiles wasserlösliches Polymer, insbesondere ein hydrophiles wasserlösliches organisches Polymer. Besonders geeignet sind Polysaccharide, insbesondere Polysaccharide mit endständigen Hydroxylgruppen, wie etwa Dextran oder

30

Stärke. Besonders bevorzugt ist Dextran. Die hydrophile wasserhaltige Polymermatrix wird besonders vorteilhaft als Hüllpolymer um einen magnetischen Kern bereitgestellt, beispielsweise in Form von Dextran-Magnetitpartikeln.

5

Die hydrophile wasserhaltige Polymermatrix kann auf ihrer Oberfläche hydrophile oder/und hydrophobe Gruppen enthalten. Bevorzugt ist eine Ausführungsform, in der eine Festphase verwendet wird, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Gruppen, wie oben beschrieben, auf der  
10 Oberfläche aufweist und gleichzeitig eine hydrophile wasserhaltige Polymermatrix umfaßt.

Eine Festphase mit einer hydrophilen wasserhaltigen Polymermatrix kann in gleicher Weise wie oben beschrieben in einem Verfahren zur Isolierung  
15 oder/und Aufreinigung von Nukleinsäuren oder in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe eingesetzt werden. Darüber hinaus kann sie zur Bestimmung der Nukleinsequenz einer Nukleinsäure oder zur Synthetisierung von Nukleinsäuren herangezogen werden.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die beigefügten Figuren und folgenden Beispiele weiter erläutert.

Figur 1 (bestehend aus Fig.1a und 1b) zeigt ein Agarosegel von  
25 erfindungsgemäß aufgereinigten PCR-Produkten sowie von PCR-Produkten, die unter Verwendung von COOH-beschichteten Partikeln aufgereinigt wurden:

Figur 1a zeigt einen Ausbeutevergleich unter Verwendung eines  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -  
Bindepuffers (links) sowie eines  $\text{NaCl}$ -Bindepuffers (rechts) für  
30 erfindungsgemäß aufgereinigte PCR-Produkte (C18/OH-Beads) sowie für PCR-Produkte, die unter Verwendung von COOH-beschichteten Partilen aufgereinigt wurden (COOH-Beads).

Figur 1b zeigt einen weiteren Ausbeutevergleich mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Bindepuffer.

- 18 -

Figur 2 (bestehend aus Fig. 2a, 2b und 2c) zeigt die Isolierung und Aufreinigung von ssDNA und dsDNA mit dem erfindungsgemäßen Verfahren für eine MALDI-MS-Analytik:

5      Figur 2a zeigt das MALDI-Flugzeitmassenspektrum von erfindungsgemäß aufgereinigten PCR-Produkten mit 47 bzw. 48 Basenpaaren.

Figur 2b zeigt das MALDI-Flugzeitmassenspektrum eines erfindungsgemäß aufgereinigten PCR-Produktes mit 80 bp.

10      Figur 2c zeigt das MALDI-Flugzeitmassenspektrum eines erfindungsgemäß aufgereinigten 24 Nukleotide langen DNA Einzelstrangs.

Bei MALDI werden bevorzugt einfach geladene Molekülionen der Spezies  $(M + H)^+$ , und daneben mit verringerter Häufigkeit auch doppelt geladene Molekülionen der Spezies  $(M + 2H)^{2+}$  gebildet. PCR-Produkte werden bei der MALDI-Massenspektrometrie, sofern nicht besondere Maßnahmen ergriffen werden, aufgetrennt und in Form der Einzelstränge detektiert. Die Signale zueinander komplementärer Einzelstränge werden oft aufgrund geringer Massenunterschiede nur partiell aufgelöst. Die Größe der PCR-Produkte läßt sich dennoch durch Vergleich der gemessenen mittleren Massen mit abgeschätzten oder aufgrund von bekannten Sequenzen berechneten Werten bestimmen. Die  $(M + H)^+$ -Signale nicht abgetrennter Primer würden in den Spektren an den mit den Pfeilen gekennzeichneten Positionen registriert werden.

25

## Beispiele

### Beispiel 1 dsDNA-Isolierung und Aufreinigung aus PCR (Polymerasekettenreaktion)

5

Magnetische Partikel, deren Oberfläche hydrophobe und hydrophile Gruppen aufweist, werden zunächst dreimal mit 150  $\mu$ l EDTA-Lösung (0,5 mol/l, pH 8) durch magnetische Separation der Partikel und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Nach dem letzten Waschen werden die Partikel in EDTA-Lösung aufgenommen und vermischt. Die Massenkonzentration beträgt 20 mg/ml.

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Mikrotiterplatte (z.B. 96 well) vorgelegt. Zu 40  $\mu$ l Probevolumen werden 40  $\mu$ l Bindungspuffer (2,5 mol/l NaCl, 20% (Gew./Gew.) PEG6000) und 10  $\mu$ l der Partikelsuspension zugegeben, vermischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert.

Die Mikrotiterplatte mit den Proben wird anschließend für 2 min in eine Magnethalterung gestellt, der Überstand verworfen und die Partikel zweimal mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (40% Ethanol) gewaschen und anschließend an Luft 2 bis 5 min getrocknet.

Schließlich wird die Mikrotiterplatte aus dem Magnethalter entnommen und die Partikel in 20 ml Elutionspuffer (1 mmol/l Tris-HCL) resuspendiert und 5 min inkubiert. Die Mikrotiterplatte wird dann wiederum in die Magnethalterung gestellt und das Eluat nach 2 min abgenommen.

Die im Eluat enthaltene DNA konnte ohne weitere Aufreinigung für Konzentrationsbestimmungen, zu DNA-Sequenzierung usw. verwendet werden.

- 20 -

**Beispiel 2 dsDNA-Isolierung und Aufreinigung aus Zellkultur**

Zellen aus einer Übernachtskultur wurden pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 40  $\mu$ l Resuspendierungspuffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 10 mmol/l EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase A) aufgenommen und  
5 vermischt. Dann wurden 40  $\mu$ l Lysepuffer (200 mmol/l NaOH, 1% (Gew./Gew.) SDS) zugegeben und vermischt. Nach Zugabe von 40  $\mu$ l Neutralisierungspuffer (3 mol/l KOAc, pH 5,5) und Vermischen wurde 15 min bei 13.000 U/min zentrifugiert.

10

Der Überstand wurde in eine frische Mikrotiterplatte transferiert. Erfindungsgemäße magnetische Partikel wurden dreimal mit 150  $\mu$ l EDTA-Lösung (0,5 mol/l pH 8) durch magnetische Separation der Partikel und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Partikel in  
15 EDTA-Lösung aufgenommen und vermischt. Die Massekonzentration betrug 20 mg/ml.

Zu 120  $\mu$ l Probevolumen wurden 120  $\mu$ l Bindungspuffer (2,5 mol/l NaCl, 20% (Gew./Gew.) PEG 6000) und 10  $\mu$ l der Partikelsuspension zugegeben.  
20 Nach Mischen des Ansatzes wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Mikrotiterplatte mit den Proben wurde anschließend für 10 min in eine Magnethalterung gestellt, der Überstand verworfen und die Partikel zweimal mit 120  $\mu$ l Waschpuffer (70% Ethanol, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 1 mmol/l  
25 EDTA) gewaschen und anschließend an der Luft 5 min getrocknet.

Die Mikrotiterplatte wurde dann aus dem Magnethalter genommen und die Partikel in 50  $\mu$ l Elutionspuffer (1 mmol/l Tris-HCL, pH 8) resuspendiert, 5 min inkubiert und die Platte dann wieder in den Magnethalter gestellt und  
30 das Eluat nach 2 min abgenommen.

- 21 -

Die im Eluat enthaltene DNA konnte ohne weitere Aufreinigung für Konzentrationsbestimmungen, DNA-Sequenzierung usw. verwendet werden.

### Beispiel 3 Ausbeutevergleich

5  
Figur 1 zeigt das Agarosegel von aufgereinigten 100 bp PCR-Produkten. Die Aufreinigung wurde zum einen gemäß der Erfindung und zum anderen unter Verwendung von COOH-beschichteten Partikeln (vgl. US-Patent 5,705,628) durchgeführt. Den PCR-Produkten wurden vor der Aufreinigung 100 pmol  
10 einer 32 Nukleotide großen ssDNA zugegeben. Wie man aus der Abbildung des Agarose-Gels sehen kann, wurde die gewünschte Nukleinsäure in gereinigter Form erhalten und unerwünschte Substanzen inklusive der 32 Nukleotide ssDNA abgetrennt. Weiterhin ist die Ausbeute beim erfindungs-  
gemäßen Verfahren deutlich höher als den COOH-beschichteten Partikeln.

15

### Beispiel 4 Aufreinigungsprotokolle

Zur Aufreinigung von Doppelstrang DNA (vgl. Figur 2a und 2b) wurden PCR-Reaktionen jeweils in 40 µl Reaktionsvolumina in 96iger Titerplatten  
20 durchgeführt. Magnetische Partikel wurden vor Gebrauch magnetisch separiert, wobei überstehende Lösung abpipetiert und die Partikel in einem Aliquot des Bindungspuffers resuspendiert wurden. Nach Abschluß der Amplifikationsreaktion wurden zu jedem Reaktionsgefäß 5 µl der Suspension der magnetischen Partikel zugegeben, gefolgt von 50 µl Bindungspuffer und  
25 zwar für die PCR-Produkte mit 47/48 bp (vgl. Figur 2a): 1,5 M NH<sub>4</sub>Cl/40 mM MgCl<sub>2</sub> in 40 % (Gew./Gew.) PEG 6000/60% (Gew./Gew.) H<sub>2</sub>O und für das PCR Produkt mit 80 bp: 2,5 M NH<sub>4</sub>Cl in 30 % (Gew./Gew.) PEG 6000/70% (Gew./Gew.) H<sub>2</sub>O.

30 Die resultierende Suspension wurde gut durchmischt und 10 min stehengelassen. Danach wurden die Partikel magnetisch separiert, der Überstand abpipetiert und durch 105 µl 65 % (vol/vol) Ethanol/35 % (vol/vol) H<sub>2</sub>O

(Waschlösung 1) ersetzt. Durch Umsetzen der Gefäße wurden die magnetischen Partikel zweimal durch die Waschlösung bewegt. Anschließend wurde der Überstand nacheinander durch 115, 125 und 135  $\mu$ l 1,5 M Ammoniumacetat in 30 % (vol/vol) H<sub>2</sub>O, 70 % (vol/vol) Ethanol ersetzt, wobei die Partikel jeweils fünfmal durch die neue Waschlösung 2 bewegt wurden. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Schließlich wurden die Partikel zweimal mit 145  $\mu$ l 80 % (vol/vol) Ethanol/20 % (vol/vol) H<sub>2</sub>O (Waschlösung 3) gewaschen, wobei die Partikel jeweils zweimal durch die Lösung bewegt wurden. Nach Abpipettieren des letzten Überstandes wurden die Partikel zum Abdampfen des verbliebenen Ethanols 10 min an Luft stehen gelassen. Anschließend wurden die Partikel in 5  $\mu$ l 1 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Elutionslösung) resuspendiert. Nach 10 min wurden die Partikel magnetisch abgetrennt und 0,5  $\mu$ l des Überstandes auf einen frischgereinigten MALDI-Probenträger überführt und dort mit 0,5  $\mu$ l Matrixlösung (200 mM 3-Hydroxypicolinsäure in 30 % (vol/vol) Acetonitril/70 % H<sub>2</sub>O (vol/vol)) vermischt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde die Probe in einen Bruker Reflex II MALDI-Flugzeitmassenspektrometer analysiert.

Zur Aufreinigung der Einzelstrang-DNA (vgl. Figur 2c) wurden 10 pmol eines 24 Nukleotide langen Oligodeoxyribonukleotids in 40  $\mu$ l PCR-Reaktionslösung vorgelegt und hierzu 5  $\mu$ l der Suspension der magnetischen Partikel (in Bindepuffer) gegeben, gefolgt von 50  $\mu$ l Bindepuffer (1,5 M NH<sub>4</sub>Cl/40 mM MgCl<sub>2</sub> in 35 % (Gew./Gew.) PEG 6000/30 % (vol/vol) Ethanol. Die Waschprozedur unterschied sich von der obigen darin, daß die erste Waschung ausgelassen wurde und die Waschlösung 2 durch 100 mM Ammoniumacetat in 30% (vol/vol) H<sub>2</sub>O/70% (vol/vol) Ethanol ersetzt wurde. Die Elution und anschließende Analyse des aufgereinigten Produkts wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Anbinden von Nukleinsäuren an eine Festphase,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß eine Nukleinsäuren enthaltende Lösung mit einer Festphase, die  
hydrophobe und hydrophile Gruppen auf der Oberfläche aufweist, in  
Gegenwart eines Salzes und Polyethylenglykols in Kontakt gebracht  
wird, wobei die Nukleinsäuren reversibel und sequenzunspezifisch an  
die Oberfläche gebunden werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß besagte Oberfläche Alkyl- oder Arylgruppen als hydrophobe  
Gruppen aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Alkylgruppen ausgewählt werden aus C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>18</sub>-Alkyl und  
Mischungen davon.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Oberfläche Hydroxylgruppen als hydrophile Gruppen  
aufweist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es sich bei der Festphase um Festpartikel handelt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,



- 24 -

daß die Festphase magnetisch ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
5       daß es sich bei dem Salz um ein Alkali-, Erdalkali- oder/und Ammoniumhalogenid handelt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
10       daß ein Polyethylenglykol mit einer mittleren Molmasse von 1000 bis 20000 g/mol zugegeben wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
15       daß das Salz in einer finalen Konzentration von 5 mmol/l bis 4 mol/l verwendet wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
20       daß Polyethylenglykol in einer finalen Konzentration von 5 Gew.% bis 40 Gew.-% verwendet wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
25       daß es sich bei der Nukleinsäure um DNA handelt.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
      daß es sich bei der Nukleinsäure um Amplifikationsprodukte handelt.  
30
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**

- 25 -

daß selektiv Einzelstrang- oder Doppelstrang-Nukleinsäuren gebunden werden.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
5 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Nukleinsäure in einem Bereich von  $\geq 5$  Nukleotide bis  $\leq$  1000 Nukleotide selektiv hinsichtlich der Größe gebunden wird.
15. Verfahren zur Isolierung oder/und Aufreinigung von Nukleinsäuren  
10 umfassend die Schritte
- (a) Bereitstellen einer Nukleinsäure enthaltenden Lösung,
  - (b) Inkontaktbringen der Nukleinsäure enthaltenden Lösung mit einer Festphase, die hydrophobe und hydrophile Gruppen auf der Oberfläche aufweist, in Gegenwart eines Salzes und Poly-  
15 ethylenglykol, wobei die Nukleinsäure reversibel und sequenz-unspezifisch an die Oberfläche gebunden wird,
  - (c) Abtrennen der Festphase von der Lösung und
  - (d) gegebenenfalls Ablösen der Nukleinsäure von der Festphase.
- 20 16. Verfahren nach Anspruch 15,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Festphase magnetisch ist und das Abtrennen der Festphase von der Lösung durch magnetische Mittel erfolgt.
- 25 17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die in Schritt (c) abgetrennte Festphase mit einer Pufferlösung gewaschen wird, welche an die Festphase gebundene Verunreinigungen, nicht aber an die Festphase gebundene Nukleinsäuren löst.
- 30 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17,  
**dadurch gekennzeichnet,**

- 26 -

daß das Ablösen der Nukleinsäure in Schritt (d) mittels einer Elutionslösung durchgeführt wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18,  
5       dadurch gekennzeichnet,  
      daß von der Festphase abgelöste Nukleinsäure und die Festphase mit magnetischen Mitteln getrennt werden.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19,  
10       dadurch gekennzeichnet,  
      daß die gewonnene Nukleinsäure einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen wird.
21. Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidsequenz einer Nukleinsäure  
15       umfassend die Schritte:  
      (a) Anbinden einer Nukleinsäure an eine Festphase gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1 und  
      (b) Sequenzieren der Nukleinsäure nach bekannten Verfahren.
22. Verfahren nach Anspruch 21, weiterhin umfassend den Schritt  
20       (c) Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte.
23. Verfahren zur Synthetisierung von Nukleinsäuren umfassend die Schritte  
25       (a) Anbinden einer Nukleinsäure an eine Festphase gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1 und  
      (b) Verlängern der Nukleinsäure um mindestens ein Nukleotid nach bekannten Verfahren.
24. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe,  
30       dadurch gekennzeichnet,

- 27 -

daß man eine Nukleinsäuren enthaltende Lösung mit einer Festphase, die hydrophobe und hydrophile Gruppen auf der Oberfläche aufweist, in Gegenwart eines Salzes und Polyethylenglykols in Kontrakt bringt, wobei die Nukleinsäuren reversibel und sequenzunspezifisch an die Oberfläche gebunden werden, anschließend diese Festphase mit der Probe in Kontakt bringt und den Analyten über die Bindung an die gebundenen Nukleinsäuren nachweist.

25. Reagenzienkit zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 24 umfassend:
- (a) einen Bindepuffer, der ein Salz und ein Polyethylenglykol enthält und
  - (b) eine Festphase, die hydrophobe und hydrophile Gruppen auf der Oberfläche aufweist.
26. Reagenzienkit nach Anspruch 25, weiterhin umfassend,
- (c) einen Elutionspuffer, mit dem an diese Oberfläche gebundene Nukleinsäure abgelöst werden können,
  - (d) einen Waschpuffer, mit dem an die Festphase gebundene Verunreinigungen abgetrennt werden können.
27. Verfahren zum Anbinden von Nukleinsäuren an eine Festphase, dadurch gekennzeichnet,
- daß man eine Nukleinsäuren enthaltende Lösung mit einer Festphase, welche eine hydrophile wasserhaltige Polymermatrix umfaßt, in Gegenwart eines wasserentziehenden Reagenz in Kontakt bringt, wobei die Nukleinsäuren reversibel und sequenzunspezifisch an die Festphase gebunden werden.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet,

- 28 -

daß die Polymermatrix ein hydrophiles wasserlösliches Polymer enthält.

29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28,  
5       dadurch gekennzeichnet,  
      daß die Polymermatrix ein hydrophiles organisches Polymer enthält.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29,  
      dadurch gekennzeichnet,  
10       daß die hydrophile Polymermatrix ein Polysaccharid umfaßt.
31. Verfahren nach Anspruch 30,  
      dadurch gekennzeichnet,  
      daß es sich um ein Polysaccharid mit endständigen Hydroxylgruppen  
15       handelt.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31,  
      dadurch gekennzeichnet,  
      daß es sich bei dem Polysaccharid um Dextran handelt.
- 20       33. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 32,  
      dadurch gekennzeichnet,  
      daß das wasserentziehende Reagenz ausgewählt wird aus der Gruppe  
      bestehend aus Salzen und Polyethylenglykol oder Gemischen davon.
- 25       34. Verfahren nach Anspruch 33,  
      dadurch gekennzeichnet,  
      daß als wasserentziehendes Reagenz ein chaotroper Salzpuffer  
      zugegeben wird.
- 30       35. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 34,  
      dadurch gekennzeichnet,

- 29 -

daß die hydrophile wasserhaltige Polymermatrix ein Hüllpolymer um einen magnetischen Kern bildet.

36. Verfahren nach Anspruch 35,  
5       dadurch gekennzeichnet,  
      daß es sich bei dem magnetischen Kern um Magnetit handelt.
37. Verfahren zur Isolierung oder/und Aufreinigung von Nukleinsäuren,  
      umfassend die Schritte  
10       (a)   Bereitstellen einer Nukleinsäure enthaltenden Lösung,  
      (b)   Inkontaktbringen der Nukleinsäure enthaltenden Lösung mit  
          einer Festphase, welche eine hydrophile wasserhaltige  
          Polymermatrix umfaßt, in Gegenwart eines wasserentziehenden  
          Reagenz, wobei die Nukleinsäure reversibel und sequenz-  
15       unspezifisch an die Festphase gebunden wird,  
      (c)   Abtrennen der Festphase von der Lösung und  
      (d)   gegebenenfalls Ablösen der Nukleinsäure von der Festphase.
38. Verfahren nach Anspruch 37, weiterhin umfassend eines oder  
20       mehrere Merkmale der Ansprüche 16 bis 20.
39. Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidsequenz einer Nukleinsäure,  
      umfassend die Schritte:  
      (a)   Anbinden einer Nukleinsäure an eine Festphase gemäß dem  
25       Verfahren nach Anspruch 27 und  
      (b)   Sequenzieren der Nukleinsäure nach bekannten Verfahren.
40. Verfahren nach Anspruch 39, weiterhin umfassend den Schritt:  
      (c)   Aufreinigen der Sequenzierungsprodukte.  
30
41. Verfahren zur Synthetisierung von Nukleinsäuren, umfassend die  
      Schritte:

- 30 -

- (a) Anbinden einer Nukleinsäure an eine Festphase gemäß dem Verfahren nach Anspruch 27 und
- (b) Verlängern der Nukleinsäure um mindestens ein Nukleotid nach bekannten Verfahren.

5

42. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäuren enthaltende Lösung mit einer Festphase, welche eine hydrophile wasserhaltige Polymermatrix umfaßt, in Gegenwart eines wasserentziehenden Reagenz in Kontakt bringt, wobei die Nukleinsäuren reversibel und sequenzunspezifisch an die Festphase gebunden werden, anschließend die Festphase mit der Probe in Kontakt bringt und den Analyten über die Bindung an die gebundenen Nukleinsäuren nachweist.

15

43. Reagenzienkit zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 27 bis 42, umfassend:

- (a) einen Bindepuffer, der ein wasserentziehendes Reagenz enthält und
- (b) eine Festphase, welche eine hydrophile wasserhaltige Polymermatrix umfaßt.

20

44. Reagenzienkit nach Anspruch 43, weiterhin umfassend:

- (c) einen Elutionspuffer, mit dem an die Oberfläche gebundene Nukleinsäuren abgelöst werden können, und
- (d) einen Waschpuffer, mit dem an die Festphase gebundene Verunreinigungen abgetrennt werden können.

25

30

Fig. 1a

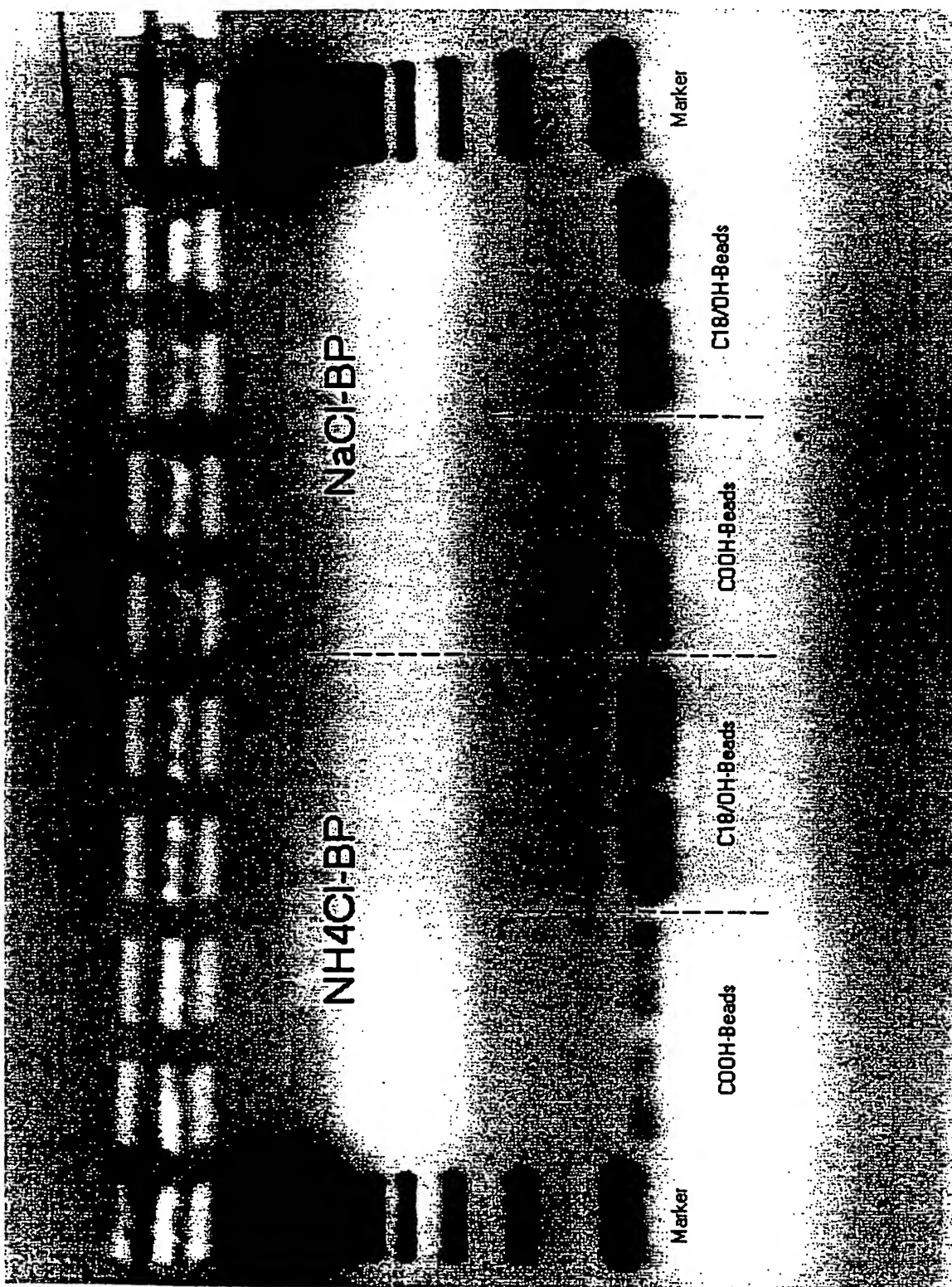




Fig. 1b

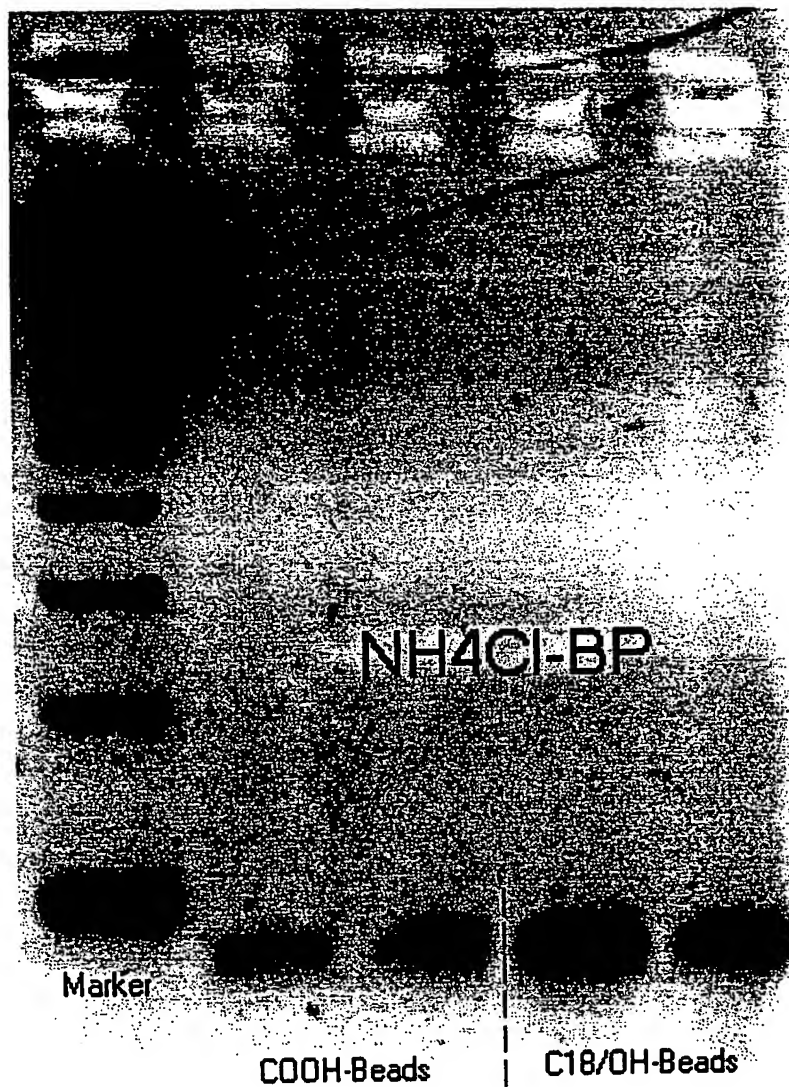
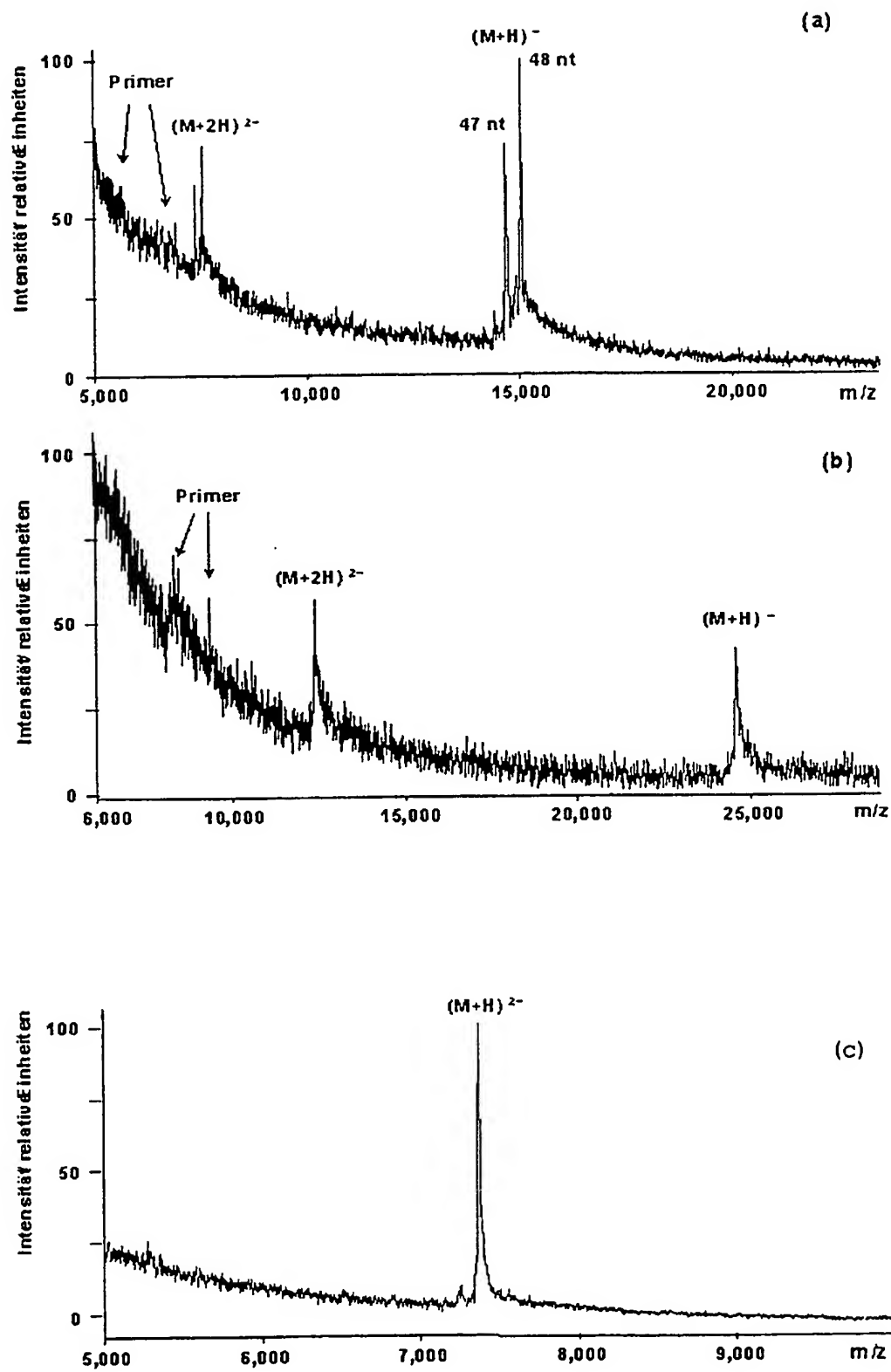


Fig. 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/EP 00/08807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/10 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 705 628 A (HAWKINS TREVOR) 6 January 1998 (1998-01-06) column 1, line 55 - line 63 column 2, line 34 - line 60 column 3, line 7 - column 4, line 17; claims 1-29; examples 1-7	1-44
X	EP 0 389 063 A (AKZO NV) 26 September 1990 (1990-09-26)  page 5, line 20 - line 37 claims 1-15; examples H1, I1; table H1  -/-	1-5, 7, 15, 17, 18, 20-34, 37-44

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2001

Date of mailing of the international search report

05/02/2001

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No

PCT/EP 00/08807

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 579 661 A (HEDMAN PER O ET AL) 1 April 1986 (1986-04-01)	1,2,4,5, 7-15,17, 18, 20-29, 33,34, 37-44
A	column 8, line 37 - line 49; claims 1-6 --- EP 0 580 305 A (ADVANCED GENETIC TECH) 26 January 1994 (1994-01-26) claims 2,7-11,17-23 -----	1-44

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interr      Application No

PCT/EP 00/08807

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5705628	A	06-01-1998	US 5898071 A WO 9609379 A	27-04-1999 28-03-1996
EP 0389063	A	26-09-1990	NL 8900725 A AT 156830 T AU 641641 B AU 5215390 A CA 2012777 A DE 69031237 D DE 69031237 T DE 389063 T DK 389063 T EP 0819696 A ES 2085245 T GR 96300019 T GR 3025351 T JP 2289596 A JP 2680462 B JP 10072485 A KR 148693 B US 5234809 A ZA 9002190 A	16-10-1990 15-08-1997 30-09-1993 27-09-1990 23-09-1990 18-09-1997 02-01-1998 10-10-1996 30-03-1998 21-01-1998 01-06-1996 31-03-1996 27-02-1998 29-11-1990 19-11-1997 17-03-1998 01-08-1998 10-08-1993 24-12-1991
US 4579661	A	01-04-1986	AT 30047 T DE 3466558 D EP 0140966 A JP 60501209 T SE 8302483 A WO 8404309 A	15-10-1987 05-11-1987 15-05-1985 01-08-1985 03-11-1984 08-11-1984
EP 0580305	A	26-01-1994	AT 184879 T DE 69326507 D DE 69326507 T JP 6078769 A	15-10-1999 28-10-1999 27-04-2000 22-03-1994

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern Aktenzeichen

PCT/EP 00/08807

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/10 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 705 628 A (HAWKINS TREVOR) 6. Januar 1998 (1998-01-06) Spalte 1, Zeile 55 - Zeile 63 Spalte 2, Zeile 34 - Zeile 60 Spalte 3, Zeile 7 - Spalte 4, Zeile 17; Ansprüche 1-29; Beispiele 1-7	1-44
X	EP 0 389 063 A (AKZO NV) 26. September 1990 (1990-09-26)  Seite 5, Zeile 20 - Zeile 37 Ansprüche 1-15; Beispiele H1, I1; Tabelle H1  ----- -/--	1-5, 7, 15, 17, 18, 20-34, 37-44



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 579 661 A (HEDMAN PER O ET AL) 1. April 1986 (1986-04-01)  Spalte 8, Zeile 37 - Zeile 49; Ansprüche 1-6	1,2,4,5, 7-15,17, 18, 20-29, 33,34, 37-44
A	EP 0 580 305 A (ADVANCED GENETIC TECH) 26. Januar 1994 (1994-01-26) Ansprüche 2,7-11,17-23	1-44

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Pat. Zeichen

PCT/EP 00/08807

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5705628 A	06-01-1998	US 5898071 A WO 9609379 A	27-04-1999 28-03-1996
EP 0389063 A	26-09-1990	NL 8900725 A AT 156830 T AU 641641 B AU 5215390 A CA 2012777 A DE 69031237 D DE 69031237 T DE 389063 T DK 389063 T EP 0819696 A ES 2085245 T GR 96300019 T GR 3025351 T JP 2289596 A JP 2680462 B JP 10072485 A KR 148693 B US 5234809 A ZA 9002190 A	16-10-1990 15-08-1997 30-09-1993 27-09-1990 23-09-1990 18-09-1997 02-01-1998 10-10-1996 30-03-1998 21-01-1998 01-06-1996 31-03-1996 27-02-1998 29-11-1990 19-11-1997 17-03-1998 01-08-1998 10-08-1993 24-12-1991
US 4579661 A	01-04-1986	AT 30047 T DE 3466558 D EP 0140966 A JP 60501209 T SE 8302483 A WO 8404309 A	15-10-1987 05-11-1987 15-05-1985 01-08-1985 03-11-1984 08-11-1984
EP 0580305 A	26-01-1994	AT 184879 T DE 69326507 D DE 69326507 T JP 6078769 A	15-10-1999 28-10-1999 27-04-2000 22-03-1994



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**